



INTERNATIONALES BUREAU
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/63071
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Dezember 1999 (09.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE99/01684		
(22) Internationales Anmeldedatum:	2. Juni 1999 (02.06.99)		
(30) Prioritätsdaten:	198 24 811.3	3. Juni 1998 (03.06.98)	DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(72) Erfinder; und			Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROTHBARTH, Karsten [DE/DE]; Im Brünnel 20, D-69493 Hirschberg (DE). STAMMER, Hermann [DE/DE]; Linsenbühl 3, D-69221 Dossenheim (DE). WERNER, Dieter [DE/DE]; Neuer Weg 22, D-69118 Heidelberg (DE).			Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) Title: METHOD FOR TRIGGERING APOPTOSIS IN CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AUSLÖSUNG VON APOPTOSE IN ZELLEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for triggering apoptosis, whereby the C1D gene in cells, more particularly, in tumor cells, is overexpressed. This occurs, for instance, by introducing corresponding expression constructs in the cells or by exogenous stimulation of the expression of the cell's own C1D gene.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auslösung von Apoptose, in dem in Zellen, insbesondere Tumorzellen, das C1D-Gen überexprimiert wird. Dies geschieht beispielsweise durch Einbringen entsprechender Expressionskonstrukte in die Zellen oder durch exogene Stimulation der Expression des zelleigenen C1D-Gens.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen, insbesondere Tumorzellen.

Apoptose ist der programmierte Zelltod. Dieser unterliegt einer genauen Regulation, wobei Apoptose induziert bzw. inhibiert werden kann.

Die Induktion von Apoptose kann bekanntermaßen über eine Reihe von sog. Todesrezeptoren, d.h. Rezeptoren, die eine "Death Domain" (DD) enthalten, wie CD95, TNF-RI, DR3, DR4 oder DR5, erfolgen, die nach Bindung ihrer Liganden Apoptose-Signalwege induzieren. Beispielsweise interagiert nach Bindung des CD95-Liganden der CD95-Rezeptor mit dem Adapterprotein FADD/MORT1, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE/Caspase-8, am DISC "Death Inducing Signalling Complex" induziert werden. FADD und FLICE enthalten jeweils "Death Effector Domains" (DED). Die Induktion der Apoptose über diese Apoptose-Signalwege ist von außen beispielsweise durch die Gabe von Zellgiften (cytotoxischen Substanzen), Bestrahlung, Viren, Entzug von Wachstumsfaktoren oder mechanische Zellverletzung möglich. Diese Möglichkeiten der Apoptose-Induktion sind allerdings von bestimmten Nachteilen begleitet. So führt die Gabe von Zellgiften, wie Zytostatika, oder die Bestrahlung bei Krebszellen zur Resistenzentwicklung und darüberhinaus zu einer Schädigung normaler Zellen, bei denen eigentlich keine Apoptose ausgelöst werden sollte.

So besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit der Apoptose, z.B. zur Bekämpfung von malignem Wachstum, unter Reduktion der oben beschriebenen Nebenwirkungen ausgelöst werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den

Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen der Erfinder, daß in Tieren, besonders Säugetieren ganz besonders dem Menschen, ein Protein vorliegt, das sich zur Induktion von Apoptose eignet. Ein solches Protein weist eine Größe von ca. 16 kD auf und wurde bisher als DNA-bindendes Protein charakterisiert (Nehls et al., Nucleic Acids Research, 26, S. 1160-1166 (1998)).

Von den Erfindern wurde erkannt, daß das zur Induktion von Apoptose geeignete Protein (nachstehend mit C1D bezeichnet) in jeder Zelle, auch in Tumorzellen vorhanden ist, und dort in einer vom Organismus vorgegebenen Menge exprimiert wird. Kommt es zu einer Überexpression des C1D-Genprodukts, wird in den überexprimierenden Zellen Apoptose ausgelöst. Aber gerade in Tumorzellen ist eine durch Überexpression erzielte Apoptose wünschenswert. Diese Überexpression kann per se die Tumorzellen abtöten. Weiter könnte sie die durch die übliche Tumorbehandlung, wie Chemotherapie oder Bestrahlung, bewirkte Apoptose verstärken. Außerdem könnte in Tumorzellen Apoptose bewirkt werden, bei denen sich durch übliche Behandlungswege schon eine Resistenz entwickelt hat. Von den Erfindern wurde jetzt herausgefunden, daß die Auslösung von Apoptose dadurch bewirkt werden kann, daß das C1D-Gen zur Überexpression gebracht wird, d.h. die Konzentration der zellulären C1D-Genprodukts erhöht wird. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß die Zellen mit Expressionskonstrukten transfiziert werden, die das C1D-Gen exprimieren oder das endogene C1D-Gen zur Überexpression stimuliert wird.

Das C1D-Genprodukt umfaßt die Sequenz von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz. Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" umfaßt jegliche für ein C1D-(verwandtes) Protein kodierende Aminosäuresequenz, deren DNA-Sequenz mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert. Bezüglich des Begriffs "hybri-

disiert" wird auf die nachstehenden Ausführungen verwiesen.

Für die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist insbesondere eine für C1D kodierende Nukleinsäure in Form einer DNA, insbesondere cDNA, geeignet. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 oder 2 hybridisiert, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Die Sequenzdaten der C1D cDNAs gemäß Fig. 1 bzw. 2 sind in der Genbank unter den folgenden Accessionnummern verfügbar:

Maus cDNA: X95591;

Mensch cDNA: X95592

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" umfaßt jegliche für ein C1D-(verwandtes) Protein kodierende DNA-Sequenz, die mit der DNA von Fig. 1 oder 2 hybridisiert. Die DNA kann sich von der DNA von Fig. 1 oder 2 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen, z.B. alternatives Splicing, unterscheiden. Erfindungsgemäß umfaßt der Begriff "DNA" auch Fragmente dieser DNA. Der Begriff "Fragment" soll einen Ausschnitt bzw. Segment des ursprünglichen Nucleinsäuremoleküls umfassen, wobei das durch dieses Fragment codierte Protein noch die Apoptose auslösenden Eigenschaften von C1D aufweist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Nucleinsäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989).

Der Fachmann ist auch in der Lage zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codiertes Protein noch über die biologische Aktivität der Apoptose-Induktion verfügt, z.B. durch Nachweis von Apoptose-typischem Zelltod gekennzeichnet durch z.B. Morphologie, multizentrische Chromatinkondensation, typische Membranveränderungen und endogene DNA-Degradation.

Der Ausdruck "DNA mit hybridisiert" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert. Der Begriff "hybridisieren" bezieht sich dabei auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen als Lösung 5xSSPE, 1% SDS, 1xDenhardts-Lösung verwendet wird und die Hybridisierungstemperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C liegen. Nach der Hybridisierung wird vorzugsweise zuerst mit 2xSSC, 1% SDS und danach mit 0,2xSSC bei Temperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C gewaschen (zur Definition von SSPE, SSC und Denhardts-Lösung siehe Sambrook et al., *supra*). Besonders bevorzugt sind stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., *supra*, beschrieben sind.

Um das C1D-Genprodukt herzustellen, das zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist, wird die für C1D kodierende DNA in einen Vektor bzw. Expressionsvektor inseriert, z.B. pBlueScript, pQE8, pUC- oder pBr322-Derivate. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression in eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Eukaryonten zählen der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, sowie CMV- oder SV40-Enhancer. Weitere Beispiele für

geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor.

In einer für gentherapeutische Zwecke bevorzugten Ausführungsform ist der die C1D-DNA enthaltende Vektor ein Virus, beispielsweise ein Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Adeno-abhängige Parvoviren (AAV). Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV. Für Zwecke der Gentherapie können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., Biotechniques 6 (1988), 682).

Allgemeine auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressions- und insbesondere Gentherapievektoren, die die oben genannten Nucleinsäuremoleküle und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind. Der Fachmann weiß somit, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann. Beispielsweise in Form eines Fusionsproteins, bei dem der andere Teil GFP (das grün fluoreszierende Protein von Aequorea Victoria) ist.

Für die Expression des C1D-Gens werden die oben genannten Expressionsvektoren in Wirtszellen eingeführt. Zu diesen Wirtszellen zählen Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen, sowohl in Kultur wie auch im lebenden Organismus. Bevorzugt sind die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur Erkennung erfolgter Transformation und Expression der erfin-

dungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfiizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Um das erfindungsgemäße Verfahren auszuführen, wird in einer bevorzugten Ausführungsform die C1D-DNA in einen Expressionsvektor, insbesondere einen Gentherapievektor, inseriert und in Zellen, bevorzugt Tumorzellen, eingeführt. Dort kommt es zur Expression von C1D-Protein, das zusätzlich zum zelleigenen Protein, zur Auslösung von Apoptose führt. Das Einbringen der Vektoren in die Zellen erfolgt unter den dem Fachmann bekannten Bedingungen. Hinsichtlich der in-vivo Gentherapie wird insbesondere auf "K.W. Culver, Gene Therapy, A Handbook for Physicians, Mary Ann Libert, Inc., New York, 1994" und "P.L. Chang, Somatic Gene Therapy, CRC Press, London, 1995" verwiesen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das zelleigene C1D-Gen zu einer vermehrten Expression stimuliert, z.B. durch exogene Stimulation des endogenen C1D-Promoters. Als Promoter bezeichnet man 5'-Nachbarsequenzen eines Gens, die als Startpunkte der RNA Polymerase II dienen, welche im Zusammenwirken mit Transkriptionsfaktoren die Expression des Gens bewirkt. Bei vielen Genen, wie auch bei C1D, ist dieser Prozeß durch exogene Faktoren induzierbar bzw. stimulierbar. Faktoren, die die spezifische Expression eines Gens bewirken sind sehr zahlreich und reichen von physikalischen Faktoren (wie Licht, Wärme, Kälte), über niedermolekulare anorganische Stoffe (wie Salze, Metallionen) und niedermolekulare organische Stoffe (Peptide, Nukleinsäurebausteine, biogene Amine, Steroide) bis zu höhermolekularen Stoffen (Serum, Wachstumsfaktoren, Immun-Stimulatien). Die für das C1D-Gen

spezifischen Stimulantien werden dadurch erkannt, daß 5'-Nachbarsequenzen, vorhanden auf z.B. den BAC (bacterial artificial chromosome) Klonen mit einem Reportergen, z.B. CAT oder EGFP, kombiniert und hinsichtlich der Reportergen-Expression bzw. deren Stimulation durch exogene Faktoren, ggf. mit einem "high-throughput"-Verfahren, untersucht werden.

Somit stellt die vorliegende Erfindung erstmalig eine Möglichkeit bereit, Apoptose nicht über die üblichen Signalwege auszulösen, sondern durch Überexpression eines bestimmten Gens. Dies kann eine besondere Bedeutung bei vielen Erkrankungen haben, insbesondere Tumorerkrankungen. Insbesondere hat sich als vorteilhaft herausgestellt, daß Tumorzellen auf eine Überexpression von C1D sehr viel empfindlicher als normale Zellen reagieren. Für normale Zellen bestehen deshalb keinerlei Nebenwirkungen, während Tumorzellen den sicheren Zelltod erleiden.

Kurze Beschreibung der Figuren:

Fig. 1 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenz von C1D aus Mensch

Fig. 2 zeigt die DNA- und Aminosäuresequenz von C1D aus Maus

Fig. 3 zeigt den zeitlichen Verlauf eines durch Überexpression von C1D ausgelösten Apoptoseprozesses in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors (Fluoreszenzmikroskopie; Anregung: 480 nm, Emission: 520 nm)

Fig. 4 zeigt Beispiele von morphologischen Besonderheiten im Verlauf eines durch Überexpression von C1D ausgelösten Apoptoseprozesses in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors (Phasenkontrastaufnahmen)

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Induktion von Apoptose durch Expression des C1D-Gens

- pcDNA 3 - C1D-Expressionskonstrukte

Die im Bluescript-Vektor (KS+, Fa. Stratagene) klonierte cDNA kodierend für menschliches bzw. murines C1D wurden durch PCR amplifiziert. Dabei wurden die folgenden Primer verwendet:

für menschliche cDNA:

Primer vorwärts:

5'-GGGGTACCATGGCAGGTGAAGAAATTAATGAAGACTAT

Primer rückwärts:

5'-GGGTCGACTTAACTTTACTTTCCCTTATTGGCAAC

(bewirkt Amplifikation der Nukleotidsequenz von Base 118 bis Base 540 gemäß Fig. 1)

für Maus cDNA:

Primer vorwärts:

5'-GGGGTACCATGGCAGGTGAAGAAATGAATGAAGATTAT

Primer rückwärts:

5'-GGGTCGACGTGTTGCTTTCCCTTATTAGCCACTTT

(bewirkt Amplifikation der Nukleotidsequenz von Base 78 bis Base 500 gemäß Fig. 2)

Mit diesen Primern wurde eine Kpn-Schnittstelle vor dem ATG-Startcodon und eine Sal I-Restriktionsstelle vor den Stop-Kodon eingeführt (sodaß das Stopkodon entfiel). Die PCR-Reaktion wurde mittels PCR Kit der Fa. Clontech (K1906-1) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der Kitbestandteile in 50 µl Volumina durchgeführt:

Wasser	38,8 µl
10x Puffer	5 µl
Mg-Acetat	2,2 µl
Primer-Vor	1 µl (10 µM)
Primer-Rück	1 µl (10 µM)
C1D-Templat	5 µl (500 ng)

50x dNTP 1 µl
Kit-Polymerase 1 µl

Cyclerprogramm:

1. Initiale Denaturierung	94°C, 1 Min.
2. Denaturierung	94°C, 30 Sec.
3. Annealing-Extension	68°C, 3 Min.
4. End-Extension	68°C, 3 Min.
5. Abkühlung	4°C

Schritte 2/3 werden 35 mal durchgeführt

Nach Restriktionsverdau des Amplifikationsansatzes mit Kpn I/Sal I wurden die Fragmente zunächst im Bluescript-Vektor (Kpn I/Sal I - vorbehandelt) rekloniert. Nach Ausschneiden der Fragmente aus dem Bluescript-Vektor mit Kpn I/Not I konnten die Sequenzen im entsprechend vorbehandelten pcDNA 3-Vektor (Fa. Invitrogen) einkloniert werden.

- pcDNA3-C1D-EGFP-Expressionskonstrukte

Die Fusion zwischen C1D und GFP (grün fluoreszierendes Protein von Aequorea Victoria) mit durchgehendem Leserahmen erfolgte auf der pBluescript-Ebene. Dazu wurden die oben beschriebenen pBluescript-(Kpn I)-C1D-(Sal I)-Plasmide durch Verdau mit Sal I/Hind III geöffnet.

Die für EGFP kodierende Sequenz (Fa. Clontech; EGFP bedeutet "enhanced green fluorescent protein" und ist eine von der Fa. Clontech hergestellte Mutante, die verbesserte Eigenschaften hinischtlich Excitation/Emission hat) wurde durch PCR amplifiziert. In dieser PCR wurden die folgenden Primer eingesetzt:

Primer vorwärts:
5'-GGGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTG

Primer rückwärts:
5'-CCAAGCTTGGATTCTAGAGTCGCGGCCGCTTTA

um am 5'-Ende eine Sal I-Stelle und am 3'-Ende (hier nach dem Stopcodon) eine Hind III-Stelle einzufügen. Die PCR wurde analog wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Nach Verdau der PCR-Amplifikationsprodukte mit Sal I und Hind

III konnten diese in die oben vorbereiteten Bluescript-(Kpn I)-C1D-(Sal I) (Hind III)-Plasmide ligiert werden. Danach wurde die Fusionskassette (Kpn I)-C1D-EGFP-(NotI) durch entsprechenden Verdau aus dem Bluescript-Vektor herausgeschnitten und in den entsprechend vorbehandelten pcDNA 3-Vektor (Kpn I/Not I) rekloniert.

- Transfektion der Vektoren in Tumorzellen

Die oben erhaltenen Expressionsvektoren wurden getrennt voneinander per Elektroporation (Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, S. 7161-7165 (1984) bzw. Lipofektion (SuperFect Transfection Reagent Handbook, Fa. Qiagen, Hilden, 02/97, 1997) in Zellen des Ehrlich Ascites Tumors transfiziert. Transfizierte (lebende Zellen) wurden im Mikroskop (Fluoreszenzoptik) beobachtet und fotografiert (Fig. 3).

Etwa 12 Stunden nach Transfektion haben 20-60% eine schwache Grünfluoreszenz im Zellkern (nicht gezeigt). Dies verweist auf die zunächst moderate Expression des Fusionsproteins. Morphologisch sind keine Besonderheiten zu erkennen. Ab etwa 24 Stunden nach Transfektion des Vektorkonstrukts treten in einzelnen Zellen Verdichtungen des Fusionsproteins auf (Fig. 3 links). Diese Verdichtungen sind auch im Phasenkontrastbild (Fig. 4) zu beobachten. Im weiteren zeitlichen Verlauf werden diese Verdichtungen stärker (Fig. 3 von links nach rechts) und das Phasenkontrastbild (Fig. 4) entspricht dem typischen Bild einer Zelle in Apoptose.

Nicht alle Zellen, die gleichzeitig transfiziert wurden, zeigen auch gleichzeitig die im Bild zu sehende übersteigerte Expressionsrate des Fusionsproteins. Zellen wie in Fig. 3 links werden auch noch nach 48-72 Stunden beobachtet, wohingegen andere Zellen schon den Endpunkt (Fig. 3 rechts) erreicht haben. Dies zeigt, daß die Zellen einer Kultur "gestaffelt" in den Apoptose-Prozeß eintreten. Bei ausreichend hoher Transfektionsrate sind letztlich alle Zellen einer Kultur, auch solche, die nicht transfiziert wurden, abgetötet. Dieser Zeitpunkt ist abhängig von der initialen

Transfektionsrate. Durch die Apoptose der transfizierten Zellen werden Faktoren abgegeben, die für nicht-transfizierte Zellen in der Kultur schädlich sind und schließlich zu Abtötung auch dieser nicht-transfizierten Zellen führen (sog. "Bystander-Effekt").

Es soll angemerkt werden, daß GFP (grün fluoreszierendes Protein von *Aequorea Victoria*) nur zur Unterscheidung transfizierter und nicht-transfizierter Zellen verwendet wurde bzw. zur Sichtbarmachung der Überexpression. GFP-Expression allein hat keinerlei Effekt auf die Zellmorphologie bzw. auf die Überlebensfähigkeit von Zellen. GFP-Fusionsproteine haben grundsätzlich die funktionellen Eigenschaften (und auch die intrazellulären Verteilungen) wie das funktionelle Genprodukt. Die in den Figuren gezeigten apoptotischen Prozesse beruhen deshalb auf einer C1D-Funktion. Die gezeigte Morphologie (und der Zellzahlverlust) wurde in Kontrollexperimenten auch durch Konstrukte bewirkt, die nur die C1D-Sequenz enthielten (z.B. durch die oben beschriebenen pcDNA 3 - C1D - Expressionskonstrukte).

Patentanspruch

1. Verfahren zur Auslösung von Apoptose in Zellen durch Überexpression des C1D-Gens.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellen Tumorzellen sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das C1D-Genprodukt die Aminosäuresequenz von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweist, wobei die DNA-Sequenz der letzteren Aminosäuresequenz mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zellen mit einem Expressionsvektor enthaltend
 - (a) die DNA von Fig. 1 bzw. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA mit der DNA von Fig. 1 bzw. 2 hybridisiert, oder
 - (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA. transfiziert werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das in den Zellen endogen enthaltene C1D-Gen stimuliert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Promotor des endogenen C1D-Gens durch extrazelluläre Faktoren stimuliert wird.

Nukleotidsequenz und Übersetzung der Mensch-C1D cDNA

CTT TCC GGG AGA CTG GAG TCG AAG GCC GTG AGT ATT TTC TAA GCC
AGT GTT TAG AGA GTA TGT GAG GCA AGA GTA CCT ATA GAA CCC GGA
GGA GGG TGA GGA GCA GAG CTG GCC ATA ATG GCA GGT GAA GAA ATT
M A G E E I
AAT GAA GAC TAT CCA GTC GAA ATT CAC GAG TAT TTG TCA GCG TTT
N E D Y P V E I H E Y L S A F
GAG AAT TCC ATT GGT GCT GTG GAT GAG ATG CTG AAG ACC ATG ATG
E N S I G A V D E M L K T M M
TCT GTT TCT AGA AAT GAG TTG TTG CAG AAG TTG GAT CCA CTT GAA
S V S R N E L L Q K L D P L E
CAA GCA AAA GTG GAT TTG GTT TCT GCA TAC ACA TTA AAT TCA ATG
Q A K V D L V S A Y T L N S M
TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACC CAA GGA GTT AAT CCT AAG GAA CAT
F W V Y L A T Q G V N P K E H
CCA GTA AAA CAG GAA TTG GAA AGA ATC AGA GTA TAT ATG AAC AGA
P V K Q E L E R I R V Y M N R
GTC AAG GAA ATA ACA GAC AAG AAA AAG GCT GGC AAG CTG GAC AGA
V K E I T D K K A G K L D R
GGT GCA GCT TCA AGA TTT GTA AAA AAT GCC CTC TGG GAA CCA AAA
G A A S R F V K N A L W E P K
TCG AAA AAT GCA TCA AAA GTT GCC AAT AAA GGA AAA AGT AAA AGT
S K N A S K V A N K G K S K S
TAA CTT TTT GGT TTT GAT GTA CAC ATA TTC AAA AAG TAC ATT AAT
ATG TAA TCA CAG TAA TAT GTA AAG CTA AAT ACT TCC TCT CCA AAG
ATC ATT TAT CTT TAT TGA TTA GCA CTG AGG ATT TTA ACA TTG TGA
TAT ATT ATA TAT TTA TAA TTT ACC ATC TCT TGA TGA GAC TCT TAT
TTC TTT ATA TAG GTC AGT CTT GCA AGT ACC ATT TTA TAA GCA GCT
GTG AAA TTT AAG TGA AAT GTT CTT TGT AAA CAT TTG TAC TAT TTT
AAA TGA ATA ATG ACC TTA TGA AGT ATG CTA TCT GTA GGC TGA AAT
TAT AGG TAC ATC TGT TTT CAC TAT ATG ATA TTA AGA AAG CGT GAA
ATG ACT TAA ATG TTC ATT TTT TTC TGT ATA GAT ACT TTA TCA TGT
TTT CAT GAT TTT AGG AAT TAC TGC TTT GTT GAT ATT CAA AGT GTG
AAA CTA AAA GTT TAT GGT TGT ACT TTA ATT CTT GGC ATG TTG CCT
CTA TGT CCC ATT TAA AAT AAA ATA CAT TCT CAT TAA CTT TAG ATG
GGA AAT AAG GTT GTA TGT TGA TGG ATG AAT TTT GCC ATG ATG ACT
GTA CTC TCA ATA AAG GCT GAA AAT GTT GTA AAA.....

Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Nukleotidsequenz und Übersetzung der Maus-C1D cDNA

CA
GAA GCC GTG TCA TGG CGT CAT CAT CGT GCG ACC TAT TTC CCG GAG
ACA GGC GTC CAC GGT ATT GAG TTG GTC ACA ATG GCA GGT GAA GAA
M A G E E
ATG AAT GAA GAT TAT CCC GTA GAA ATT CAC GAG TCT TTA ACA GCC
M N E D Y P V E I H E S L T A
CTG GAG AGC TCC CTG GGT GCT GTG GAC GAC ATG CTG AAG ACC ATG
L E S S L G A V D D M L K T M
ATG GCT GTT TCT AGA AAC GAG TTG TTG CAG AAG TTG GAC CCA TTG
M A V S R N E L L Q K L D P L
GAA CAA GCA AAG GTG GAT TTA GTT TCT GCA TAC ACC TTA AAT TCA
E Q A K V D L V S A Y T L N S
ATG TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACT CAA GGA GTT AAT CCC AAA GAG
M F W V Y L A T Q G V N P K E
CAT CCA GTG AAG CAG GAA CTG GAA AGA ATC AGA GTC TAC ATG AAC
H P V K Q E L E R I R V Y M N
AGA GTT AAA GAA ATA ACA GAC AAG AAG AAG GCT GCC AAG CTG GAC
R V K E I T D K K K A A K L D
AGA GGT GCT GCT TCG AGA TTT GTC AAG AAG GCA CTC TGG GAA CCC
R G A A S R F V K K A L W E P
AAA CGA AAA AGC ACA CCA AAA GTG GCT AAT AAA GGG AAA AGC AAA
K R K S T P K V A N K G K S K
CAC TAA TCT TTT GGT TTT GAT GTA CAT GTT TTC AAA AAG TAC ATC
H
CTT TTT AAT CAG TTT ACA ATG TAG TTA TGT GAC CAT GTG GTG TTT
AAA TGG ATT CCT TTT GGA ATT CAT GTA TAA ATT TAC ACA TTA CAT
TTG TGA TAC TGA ATC TTT TTT TTG CTG AGA AAG ATT AAG TTG TCT
TTG TTG ATT TTC ATA TAA AGC ATC ATG ATG TGT TTA ATA TTG TAA
GAT ATT CTA TAA GCA GTT GTG AAA TCC AAA TGT TCT CTG TAA ACA
TTT GTA GTG TTT GAA ATG AAC AAT GAT ATT ATG AAG TGT GCT ATC
TGT AGA CCT CGA GGT GTA AGG ACA TTT GTT TTC AGT AAT GAT GAG
AAA TAC AGT GAC TTA AAT ACC CAC TCT GTT TCT GTT CAG TTA GTT
CAA CAT GTT TCG TGA TTT TTT TTT TTT GAG TAA TTC TGT CTT
GAT ATT CAA AGT CAA AAT TGA AAC CTT AAG GCT GTA CTT TAA TTC
TTC ATG TTC CAT TTA AAA TAA AAT GTT CTC ATT AAC TCT GAT GGA
AAA

Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/4

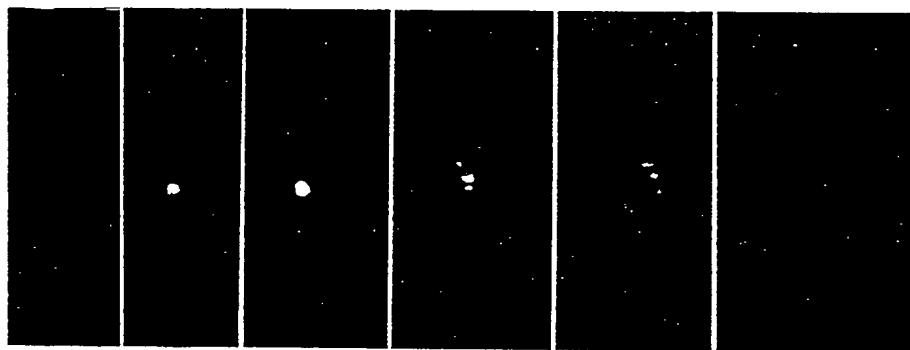


Fig. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/4

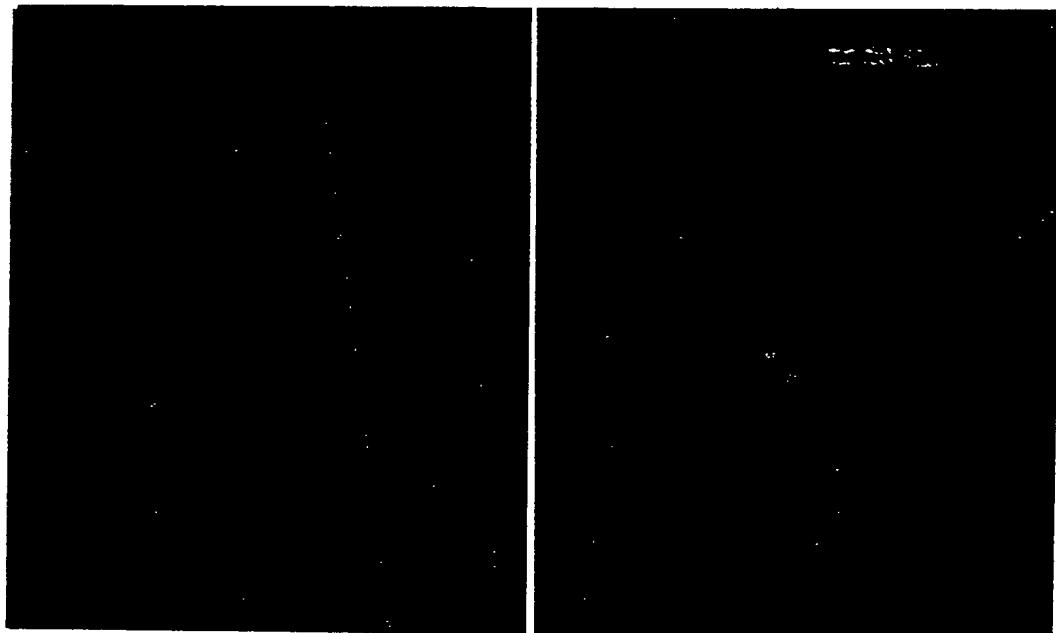
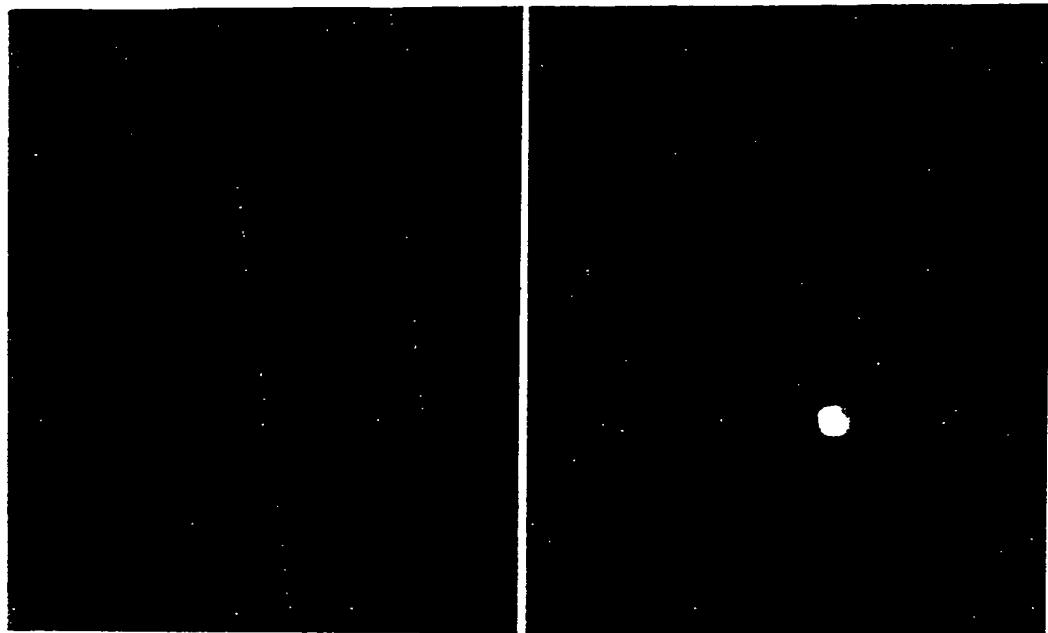


Fig. 4

ALL BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Ausloesung von Apoptose in Zellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
noch nicht bekannt

(vi) DATEN DER VORANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 198 24 811.3
ANMELDETAG: 3-JUN-1998

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1156 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 118..540

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 118..540

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CTTTCCGGGA GACTGGAGTC GAAGGCCGTG AGTATTTCT AAGCCAGTGT TTAGAGAGTA	60
TGTGAGGCCAA GAGTACCTAT AGAACCCGGA GGAGGGTGAG GAGCAGAGCT GGCCATA	117
ATG GCA GGT GAA GAA ATT AAT GAA GAC TAT CCA GTA GAA ATT CAC GAG	165
Met Ala Gly Glu Ile Asn Glu Asp Tyr Pro Val Glu Ile His Glu	
1 5 10 15	
TAT TTG TCA GCG TTT GAG AAT TCC ATT GGT GCT GTG GAT GAG ATG CTG	213
Tyr Leu Ser Ala Phe Glu Asn Ser Ile Gly Ala Val Asp Glu Met Leu	
20 25 30	
AAG ACC ATG ATG TCT GTT TCT AGA AAT GAG TTG TTG CAG AAG TTG GAT	261
Lys Thr Met Met Ser Val Ser Arg Asn Glu Leu Leu Gln Lys Leu Asp	
35 40 45	
CCA CTT GAA CAA GCA AAA GTG GAT TTG GTT TCT GCA TAC ACA TTA AAT	309
Pro Leu Glu Gln Ala Lys Val Asp Leu Val Ser Ala Tyr Thr Leu Asn	
50 55 60	
TCA ATG TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACC CAA GGA GTT AAT CCT AAG GAA	357
Ser Met Phe Trp Val Tyr Leu Ala Thr Gln Gly Val Asn Pro Lys Glu	
65 70 75 80	
CAT CCA GTA AAA CAG GAA TTG GAA AGA ATC AGA GTA TAT ATG AAC AGA	405
His Pro Val Lys Gln Glu Leu Glu Arg Ile Arg Val Tyr Met Asn Arg	
85 90 95	
GTC AAG GAA ATA ACA GAC AAG AAA AAG GCT GGC AAG CTG GAC AGA GGT	453
Val Lys Glu Ile Thr Asp Lys Lys Lys Ala Gly Lys Leu Asp Arg Gly	
100 105 110	
GCA GCT TCA AGA TTT GTA AAA AAT GCC CTC TGG GAA CCA AAA TCG AAA	501
Ala Ala Ser Arg Phe Val Lys Asn Ala Leu Trp Glu Pro Lys Ser Lys	
115 120 125	
AAT GCA TCA AAA GTT GCC AAT AAA GGA AAA AGT AAA AGT TAACTTTTG	550
Asn Ala Ser Lys Val Ala Asn Lys Gly Lys Ser Lys Ser	
130 135 140	
GTTCATGATGT ACACATATTCA AAAAGTACA TTAATATGTA ATCACAGTAA TATGTAAAGC	610
TAAATACTTC CTCTCCAAAG ATCATTATCT TTATTGATTA GCACTGAGGA TTTAACATT	670
GTGATATATT ATATATTTAT AATTACCAT CTCTTGATGA GACTCTTATT TCTTTATATA	730
GGTCAGTCTT GCAAGTACCA TTTTATAAGC AGCTGTGAAA TTTAAGTGAA ATGTTCTTG	790
TAAACATTTG TACTATTTA AATGAATAAT GACCTTATGA AGTATGCTAT CTGTAGGCTG	850
AAATTATAGG TACATCTGTT TTCACTATAT GATATTAAGA AAGCGTGAAT GACTTAAATG	910
TTCATTTTT TCTGTATAGA TACTTTATCA TGTTTCATG ATTTTAGGAA TTACTGCTTT	970

THIS PAGE BLANK (USPTO)

GTTGATATTGAA	AAAGTGTGAA	ACTAAAAGTT	TATGGTTGTA	CTTTAATTCT	TGGCATGTTG	1030
CCTCTATGTC	CCATTAAAAA	TAAAATACAT	TCTCATTAAAC	TTTAGATGGG	AAATAAGGTT	1090
GTATGTTGAT	GGATGAATT	TGGCATGATG	ACTGTACTCT	CAATAAAGGC	TGAAAATGTT	1150
GTAAAAA						1156

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ala	Gly	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Glu	Ile	His	Glu
1															15
Tyr	Leu	Ser	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Val	Asp	Glu	Met	Leu
				20				25						30	
Lys	Thr	Met	Met	Ser	Val	Ser	Arg	Asn	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Leu	Asp
				35			40						45		
Pro	Leu	Glu	Gln	Ala	Lys	Val	Asp	Leu	Val	Ser	Ala	Tyr	Thr	Leu	Asn
	50				55						60				
Ser	Met	Phe	Trp	Val	Tyr	Leu	Ala	Thr	Gln	Gly	Val	Asn	Pro	Lys	Glu
	65				70				75					80	
His	Pro	Val	Lys	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Ile	Arg	Val	Tyr	Met	Asn	Arg
				85				90						95	
Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Leu	Asp	Arg	Gly	
			100				105					110			
Ala	Ala	Ser	Arg	Phe	Val	Lys	Asn	Ala	Leu	Trp	Glu	Pro	Lys	Ser	Lys
			115				120					125			
Asn	Ala	Ser	Lys	Val	Ala	Asn	Lys	Gly	Lys	Ser	Lys	Ser			
			130			135					140				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1040 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 78..500

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE: 78..500

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CAGAAGCCGT GTCATGGCGT CATCATCGTG CGACCTATTT CCCGGAGACA GGCGTCCACG	60
GTATTGAGTT GGTCACA ATG GCA GGT GAA GAA ATG AAT GAA GAT TAT CCC	110
Met Ala Gly Glu Glu Met Asn Glu Asp Tyr Pro	
1 5 10	
GTA GAA ATT CAC GAG TCT TTA ACA GCC CTG GAG AGC TCC CTG GGT GCT	158
Val Glu Ile His Glu Ser Leu Thr Ala Leu Glu Ser Ser Leu Gly Ala	
15 20 25	
GTC GAC GAC ATG CTG AAG ACC ATG ATG GCT GTT TCT AGA AAC GAG TTG	206
Val Asp Asp Met Leu Lys Thr Met Met Ala Val Ser Arg Asn Glu Leu	
30 35 40	
TTG CAG AAG TTG GAC CCA TTG GAA CAA GCA AAG GTG GAT TTA GTT TCT	254
Leu Gln Lys Leu Asp Pro Leu Glu Gln Ala Lys Val Asp Leu Val Ser	
45 50 55	
GCA TAC ACC TTA AAT TCA ATG TTT TGG GTT TAT TTG GCA ACT CAA GGA	302
Ala Tyr Thr Leu Asn Ser Met Phe Trp Val Tyr Leu Ala Thr Gln Gly	
60 65 70 75	
GTT AAT CCC AAA GAG CAT CCA GTG AAG CAG GAA CTG GAA AGA ATC AGA	350
Val Asn Pro Lys Glu His Pro Val Lys Gln Glu Leu Glu Arg Ile Arg	
80 85 90	
GTC TAC ATG AAC AGA GTT AAA GAA ATA ACA GAC AAG AAG AAG GCT GCC	398
Val Tyr Met Asn Arg Val Lys Glu Ile Thr Asp Lys Lys Lys Ala Ala	
95 100 105	
AAG CTG GAC AGA GGT GCT GCT TCG AGA TTT GTC AAG AAG GCA CTC TGG	446

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Lys Leu Asp Arg Gly Ala Ala Ser Arg Phe Val Lys Lys Ala Leu Trp
 110 115 120

GAA CCC AAA CGA AAA AGC ACA CCA AAA GTG GCT AAT AAA GGG AAA AGC 494
 Glu Pro Lys Arg Lys Ser Thr Pro Lys Val Ala Asn Lys Gly Lys Ser
 125 130 135

AAA CAC TAATCTTTG GTTTTGATGT ACATGTTTC AAAAAGTACA TCCTTTTAA 550
 Lys His
 140

TCAGTTTACA ATGTAGTTAT GTGACCATGT GGTGTTAAA TGGATTCCCTT TTGGAATTCA 610
 TGTATAAATT TACACATTAC ATTTGTGATA CTGAATCTTT TTTTGCTGA GAAAGATTAA 670
 GTTGTCTTG TTGATTTCA TATAAAGCAT CATGATGTGT TTAATATTGT AAGATATTCT 730
 ATAAGCAGTT GTGAAATCCA AATGTTCTCT GTAAACATTT GTAGTGTGAA 790
 TGATATTATG AAGTGTGCTA TCTGTAGACC TCGAGGTGTA AGGACATTTG TTTTCAGTAA 850
 TGATGAGAAA TACAGTGACT TAAATACCCA CTCTGTTCT GTTCAGTTAG TTCAACATGT 910
 TTCTGTGATTT TTTTTTTTT TTGAGTAATT CTGTCTTGAT ATTCAAAGTC AAAATTGAAA 970
 CCTTAAGGCT GTACTTTAAT TCTTCATGTT CCATTAAAAA TAAAATGTC TCATTAACTC 1030
 TGATGGAAAA 1040

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 141 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Gly Glu Glu Met Asn Glu Asp Tyr Pro Val Glu Ile His Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Ala Leu Glu Ser Ser Leu Gly Ala Val Asp Asp Met Leu
 20 25 30

Lys Thr Met Met Ala Val Ser Arg Asn Glu Leu Leu Gln Lys Leu Asp
 35 40 45

Pro Leu Glu Gln Ala Lys Val Asp Leu Val Ser Ala Tyr Thr Leu Asn
 50 55 60

Ser Met Phe Trp Val Tyr Leu Ala Thr Gln Gly Val Asn Pro Lys Glu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

65	70	75	80
His Pro Val Lys Gln Glu Leu Glu Arg Ile Arg Val Tyr Met Asn Arg			
85		90	95
Val Lys Glu Ile Thr Asp Lys Lys Ala Ala Lys Leu Asp Arg Gly			
100		105	110
Ala Ala Ser Arg Phe Val Lys Lys Ala Leu Trp Glu Pro Lys Arg Lys			
115		120	125
Ser Thr Pro Lys Val Ala Asn Lys Gly Lys Ser Lys His			
130	135		140

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGGGTACCAT GGCAGGTGAA GAAATTAATG AAGACTAT

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGGTCGACTT AACTTTACT TTTTCCTTTA TTGGCAAC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGGGTACCAT GGCAGGTGAA GAAATGAATG AAGATTAT

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GGGTCGACGT GTTTGCTTT CCCTTTATTA GCCACTTT

38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GGGTCGACAT GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC TGTTC

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCAAGCTTG GAATTCTAGA GTCGCGGCCG CTTTA

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)